

Geneticky významné aberácie u pacientov s myelodysplastickým syndrómom a spôsoby ich detekcie

Andrea Blahová¹, Nikola Chovanová², Kristína Lengyelová¹, Alexandra Oravcová¹, Gabriela Veselá¹, Alena Žákovičová¹, Kristína Juríková¹, Jakub Petřík¹, Michaela Patáková-Zrubcová¹, Renata Lukačková¹

¹Lekárska genetika, Medirex, a. s., Bratislava

²Prírodovedecká fakulta, UK, Bratislava

Myelodysplastický syndróm (MDS) tvorí heterogénnu skupinu klonálnych hematopoetických ochorení kostnej drene. Ochorenie definuje neefektívna hematopoéza, dysplastické zmeny krvných buniek a prítomnosť cytopénie v periférnej krvi. Pacienti majú zväčša vyšší vek a približne 30 % všetkých pacientov neskôr transformuje do akútnej myeloidnej leukémie (AML). Klonálne chromozómové abnormality sú detegované približne u 50 % pacientov s primárnym MDS a u viac ako 80 % pacientov so sekundárnym MDS. Na základe konkrétnych chromozómových abnormalít sa dá predpovedať prognóza pacienta, jeho celkové prežívanie a podanie vhodnej liečby. Na vyšetrenie pacientov a na dokázanie týchto abnormalít sme použili cytogenetickú analýzu karyotypu, fluorescenčnú in situ hybridizáciu (FISH) a multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA).

Kľúčové slová: myelodysplastický syndróm, chromozómové aberácie, diagnostika

Genetically important aberrations in patients with myelodysplastic syndrome and laboratory methods of their detection

The myelodysplastic syndrome (MDS) is a heterogeneous group of clonal haematopoietic disorders originated in the bone marrow. It is characterized by ineffective haematopoiesis, dysplastic changes in blood cells and cytopenia in peripheral blood. Patients are mostly older, and around 30% of all patients later transform to acute myeloid leukemia (AML). One of the essential parameters in diagnosis is an evidence of chromosomal aberrations characteristic for this disease. Chromosomal changes are detected in approximately 50% of patients with primary MDS, and more than 80% patients are detected with secondary MDS. According to specific chromosomal abnormalities, it is possible to predict a patient's prognosis, his overall survival and an appropriate treatment. We detected these abnormalities by cytogenetic method using conventional banding techniques, fluorescence in situ hybridization (FISH) and multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA).

Keywords: myelodysplastic syndrome, chromosomal aberrations, diagnostics

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 65 – 70

Úvod

Myelodysplastický syndróm (MDS) predstavuje heterogénnu skupinu chronických myeloidných ochorení s pôvodom v kostnej dreni. Ide o klonálnu poruchu krvotvorby ako dôsledok mutácií vznikajúcich v pluripotentných kmeňových bunkách. Vplyvom mutácií dochádza k nedostatočnej maturácii, diferenciácii, resp. porušenej proliferácii, a k morfologickej dysplázii krvných elementov. Tieto zmeny vedú k vzniku inefektívnej dysplastической hematopoézy s potenciálnym rizikom transformácie MDS do akútnej myeloblastovej leukémie (AML) až v 30 % všetkých prípadov. Spoločným znakom ochorenia je hypercelulárna kostná dreň a prítomnosť rôzneho stupňa periférnej cytopénie. Typická je prítomnosť anémie, ale aj leukopénie a trombocytopénie a ich vzájomná kombinácia⁽¹⁾.

MDS patrí medzi časté hematologické malignity v Európe s celkovým výskytom približne 4 prípady na 100 000 obyvateľov za rok. Výskyt prudko stúpa so zvyšujúcim sa vekom najmä vo vekovej skupine nad 60 rokov a vo veku ≥ 80 rokov je incidencia ochorenia až 50 prípadov/100 000 obyvateľov ročne. Medián veku pri nástupe choroby je okolo 70 rokov, pričom z celkového počtu pacientov len 10 % tvoria pacienti s vekom pod 50 rokov⁽²⁾. Deti sú postihnuté zriedkavo, priebeh ochorenia a cytogenetické nálezy sú odlišné od dospelých pacientov⁽³⁾.

Príčiny vzniku MDS

Vývoj MDS je viacstupňový proces, pri ktorom dochádza k zmenám v genetickom materiáli pluripotentnej hematopoetickej kmeňovej bunky. Tá je morfologicky a funkčne odlišná a získava rastovú výhodu. Mechanizmus patogenézy MDS nie je v súčasnosti úplne objasnený, predpokladá sa postihnutie génov regulujúcich rast, diferenciáciu a zánik bunky. Takto pozmenená bunka proliferuje a postupne jej klony nahrádzajú zdravé kmeňové bunky, čím nastáva útlm alebo zastavenie normálnej krvotvorby⁽⁴⁾. Rozoznávame dva typy MDS – primárny a sekundárny. O primárnom hovoríme, keď nie je známa príčina ochorenia. Predstavuje 85 % zo všetkých MDS a postihuje hlavne staršiu populáciu s priemerným vekom 60-70 rokov. V posledných rokoch stúpa incidencia primárneho MDS, a to vzhľadom na lepšie diagnostické metódy, starnutie populácie a pôsobenie faktorov prostredia⁽⁵⁾. Pri sekundárnom MDS (~ 15 %) vieme objasniť príčiny vzniku ochorenia. Môže ich byť viacero, napríklad chemoterapia, rádioterapia alebo vplyv environmentálnych toxínov⁽⁶⁾.

Prognóza ochorenia

Priebeh ochorenia je veľmi variabilný, od najľahších foriem s priemerným prežívaním niekoľko rokov až po najťažšie formy s prežívaním nižším ako 5 mesiacov⁽⁷⁾. Z hľadiska

prognózy existuje niekoľko prognostických systémov, ktoré na základe súvisiacich znakov triedia pacientov do rizikových kategórií⁽⁸⁾. V súčasnosti sa používa **Revidovaný medzinárodný prognostický skórovací systém – IPSS-R**, ktorý delí pacientov do 5 rizikových kategórií v súlade s konkrétnymi parametrami udávajúcimi prognostický význam a podľa ktorých prebieha liečba. IPSS-R zahŕňa aj **MDS Cytogenetický skórovací systém (tabuľka 1)**, ktorý určuje prognostickú skupinu pacienta na základe cytogenetických nálezov v karyotype⁽⁹⁾.

Chromozómové aberácie

Chromozómové aberácie zohrávajú dôležitú úlohu v patogenéze, prognóze a diagnostike ochorenia. Pri primárnom MDS sa zaznamenali pri 40 – 60 % pacientoch. Pacienti so sekundárnym MDS majú spravidla viac zmien v genotype, až v 80 – 90 % sú pozorované chromozómové prestavby⁽⁶⁾. Komplexný karyotyp s viac ako tromi aberáciami naraz je pozorovaný približne u 15 % *de novo* MDS oproti 50 % pri sekundárnom MDS⁽¹⁰⁾.

Medzi najčastejšie zmeny patria **del(5q)/-5, 01507/del(7q), +8, del(20q)** a **-Y**. Menej často sa vyskytuje **-17/del(17p)/i(17q), -18/del(18q), +21, +19, inv/t/del(3q), -13/del(13q), -21, t(5q), +11, +1/+1q, del(12p), del(11q), t(7q), +mar** a iné^(7,11).

Podľa prítomných zmien v bunkách môžeme predpokladať prognózu ochorenia. U pacientov s dobrou prognózou nachádzame normálny karyotyp, prípadne len jednoduché zmeny. Priebeh ochorenia je mierny, dlhotrvajúci s prežívaním niekoľko rokov a liečba je väčšinou symptomatická. Čím je prognóza horšia, tým je kratší čas prežívania pacientov, sú prítomné rôzne genetické zmeny a je väčšia aj pravdepodobnosť leukemickej transformácie⁽¹²⁾.

Spôsoby detekcie genetických zmien

1. Cytogenetická analýza

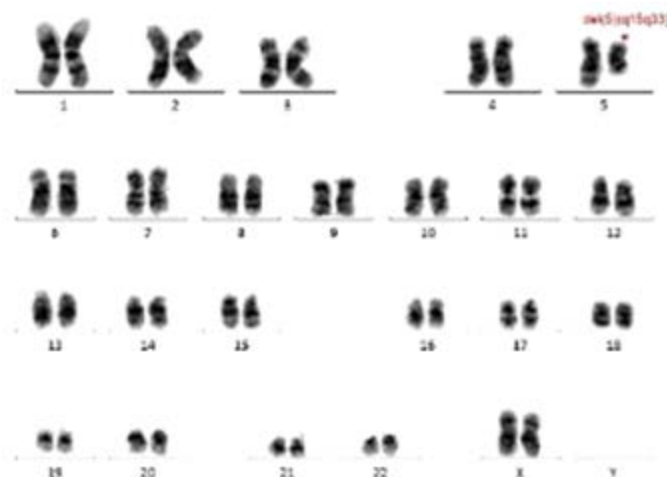
K základným metódam na detekciu aberácií patrí cytogenetická analýza chromozómov. Umožňuje sledovať numerické a štruktúrované prestavby karyotypu (**obrázok 1**). Veľkou výhodou metódy je možnosť vyšetriť všetky chromozómy v jednom pohľade. Nevýhodou je neschopnosť identifikovať submikroskopické zmeny pod detekčným limitom metódy a zároveň potreba metafáz.

2. FISH metóda

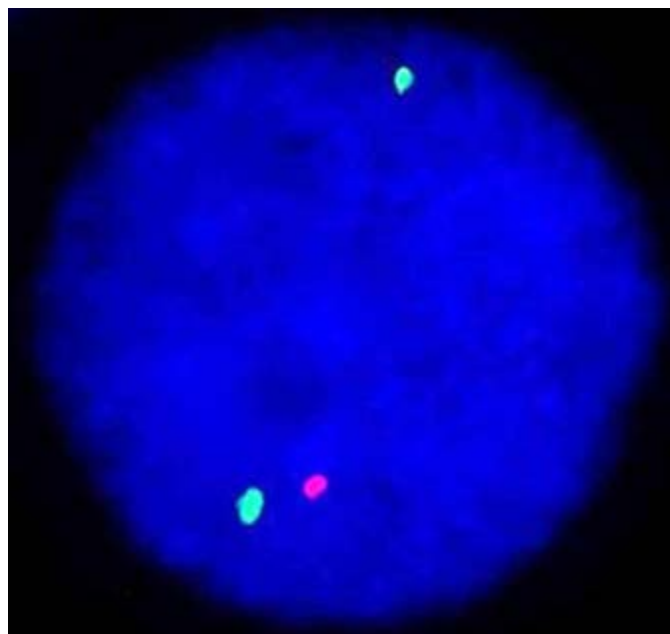
Fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH) je bežnou metódou v cytogenetických laboratóriách a k jej výhodám patrí možnosť analýzy buniek nielen v metafáze, ale aj v interfáze, keď nie je nutná kultivácia buniek. Ďalšou výhodou je rýchle

analyzovanie veľkého množstva buniek. Zároveň umožňuje odhaliť aberácie aj asi v 15 % cytogeneticky negatívnych prípadov a pomáha objasňovať komplexné prestavby. Limitujúcim faktorom metódy je možnosť identifikácie len tých úsekov DNA, pri ktorých sú použité sondy. Na relevantnú detekciu treba mať vo vzorke aspoň 1 – 5 % aberantných interfázových jadier (**obrázok 2**).

Obrázok 1. Karyotyp pacienta s MDS, 46,XX,del(5)(q15q33) (G-band, archív Medirex, a. s.)



Obrázok 2. FISH analýza s lokusovou špecifickou sondou pre oblasť 5p12 (zelený signál) a 5q31 (červený signál) potvrdzujúca deľciu 5q31 (archív Medirex, a. s.)



Tabuľka 1. MDS Cytogenetický skórovací systém^(9, upravené)

Prognostická skupina	Cytogenetické abnormality	Medián prežívania (roky)	Medián progresie do AML (roky)
Veľmi dobrá	-Y, del(11q)	5,4	nedosiahnutý
Dobrá	normálny karyotyp, del(5q), del(12p), del(20q), dvojité zahŕňajúce del(5q)	4,8	9,4
Stredná	del(7q), +8, +19, i(17q), akékoľvek iné samostatné alebo dvojité nezávislé klony	2,7	2,5
Zlá	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), dvojité zahŕňajúce -7/del(7q), komplex 3 abnormalít	1,5	1,7
Veľmi zlá	komplex > 3 abnormalít	0,7	0,7

3. MLPA analýza

Podobne ako FISH aj molekulárno-cytogenetická metóda MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) využíva naviazanie oligonukleotidových sond na cieľovú sekvenciu DNA na základe ich komplementarity. Oproti FISH je táto metóda schopná identifikovať naraz viac ako 40 rôznych sekvencií DNA v jednej reakcii⁽¹³⁾. Sondy využívané pri MLPA metóde majú kratšiu dĺžku (50 – 70 bp) a umožňujú citlivú detekciu aj iných klinicky relevantných MDS abnormalít s nižšou frekvenciou. Výhodou MLPA je odlišenie sekvencií, ktoré sa navzájom líšia rozdielom jedného nukleotidu (**obrázok 3**). Nevýhodou techniky je potreba mať vo vzorke aspoň 30 % mutovaných buniek na spoľahlivú detekciu abnormalít⁽¹⁴⁾.

Cieľom našej práce bolo:

1. Vytvoriť a analyzovať súbor pacientov s diagnózou MDS vyšetrených na našom oddelení genetiky v čase od februára 2016 do apríla 2018.
2. Zistiť prítomnosť chromozómových aberácií, charakterizovať ich, určiť ich incidenciu v súbore a rozdeliť pacientov podľa prítomných aberácií.
3. Zhodnotiť vzťah medzi výsledkami vyšetrení a prognózou.
4. Stanoviť prínos jednotlivých metód pri hodnotení chromozómových aberácií a porovnanie úspešnosti použitých metód – klasická cytogenetika, metóda FISH a metóda MLPA.

Súbor pacientov a metódy

Do práce sme zaradili pacientov s diagnózou MDS, ktorí boli vyšetřovaní v našom laboratóriu genetiky od februára 2016 do apríla 2018. Kritériom na zaradenie pacienta bola

diagnóza stanovená lekárom na žiadanke. Celkovo sme analyzovali 620 vzoriek pacientov, z toho 383 vzoriek kostnej drene (KD) a 237 vzoriek periférnej krvi (PK). V práci sme použili nasledovné metódy: cytogenetika, FISH a MLPA.

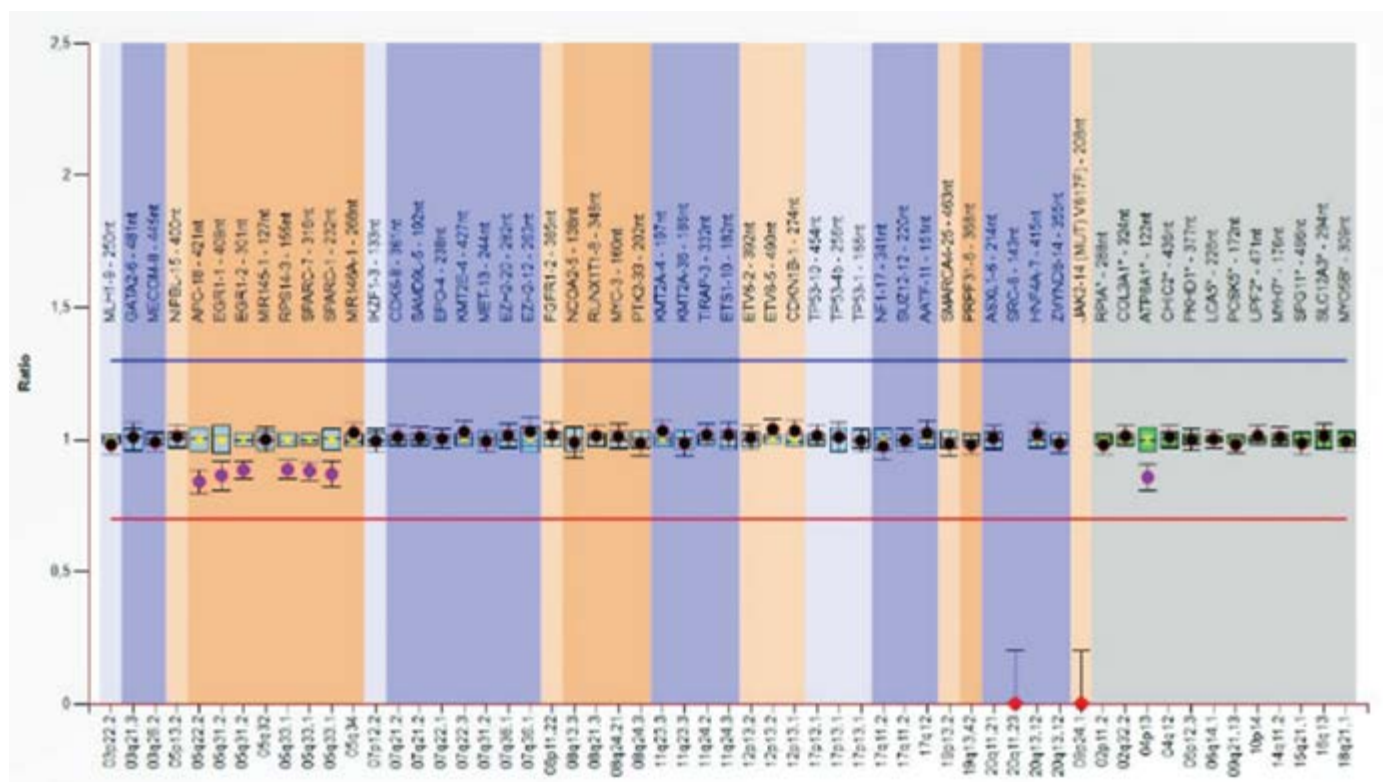
Preparáty na vyšetrenie karyotypu boli pripravené 24-hodinovou kultiváciou buniek KD v kompletnom médiu a spracované podľa štandardných postupov. U 360 pacientov bolo analyzovaných, ak to bolo možné, 20 metafáz a bol stanovený cytogenetický zápis podľa ISCN (International System of Chromosome Nomenclature). Pri metóde FISH sa ako vstupný materiál použila kultivovaná KD a/alebo PK pacienta pripravená priamym spracovaním. Následne prebehla hybridizácia s príslušnou sondou a hodnotenie preparátov pod fluorescenčným mikroskopom. Spolu bolo zhodnotených 521 vzoriek, 380 KD a 141 PK. Vstupným materiálom na analýzu MLPA bola izolovaná DNA zo vzorky KD a/alebo PK dodaná v EDTA. Na analýzy sa použil kit SALSA MLPA P414-B1 MDS probemix (MRC – Holland) na detekciu 46 špecifických chromozómových oblastí s amplifikačnými produktmi od 122 do 469 nukleotidov. Sondy sú navrhnuté na najrozšírenejšie a na prognosticky relevantné aberácie pri MDS podľa IPSS-R. Toto metódou sa vyšetřilo 398 pacientov (214 KD a 184 PK).

Výsledky

1. Charakteristika a analýza súboru pacientov

Súbor zahŕňa vzorky kostnej drene alebo periférnej krvi od 620 pacientov a pozostáva z 289 (46,6 %) pacientov mužského a 331 (53,4 %) ženského pohlavia. Vekový medián pacientov v čase určenia diagnózy bol 69 rokov s vekovým

Obrázok 3. Grafický výsledok MLPA analýzy odhaľujúci deléciu 5q22.2-5q33.1 (archív Medirex, a. s.)

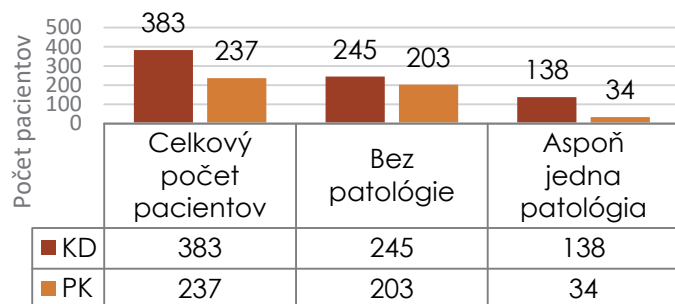


rozpätím 13 až 93 rokov. Pacienti vyšetrení zo vzorky kostnej drene mali patológie v 36 % prípadoch, pacienti vyšetrení zo vzorky periférnej krvi len v 14 % prípadoch (**obrázok 4**).

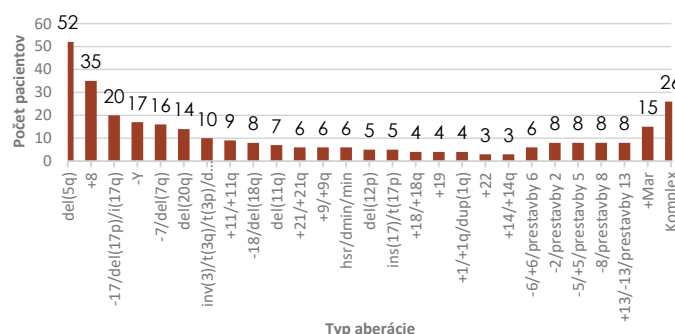
2. Incidencia chromozómových abnormalít

Z výsledkov vzoriek kostnej drene 383 pacientov, ktorí boli vyšetrení cytogeneticky, metódou FISH a/alebo MLPA, sme charakterizovali a následne stanovili výskyt najčastejších abnormalít (**obrázok 5**). Detegovali sme spolu 287 chromozómových aberácií, pričom u 99 % pacientov boli použité aspoň dve metódy na vyšetrenie. Na grafe (**obrázok 6**) je znázornené jednotlivé zastúpenie aberácií ako izolované abnormality v genóme a ako abnormality, ktoré sa vyskytli v kombinácii s inými patológiami.

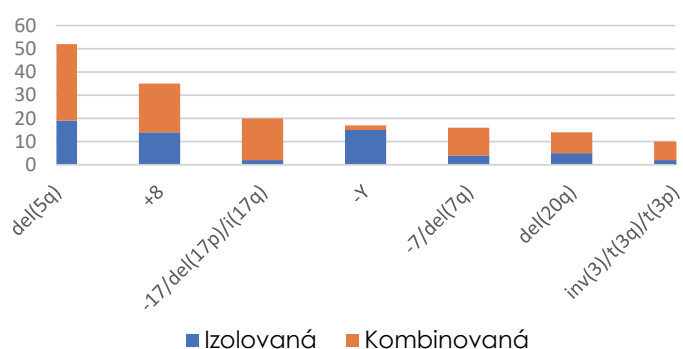
Obrázok 4. Podiel vyšetrených pacientov; graf zobrazuje celkový podiel pacientov vyšetrených zo vzorky kostnej drene (KD) a periférnej krvi (PK); podiel pacientov bez prítomnej patológie a podiel pacientov aspoň s jednou patológiou v genóme



Obrázok 5. Výskyt najčastejších abnormalít u pacientov s MDS (vzorky kostnej drene)



Obrázok 6. Grafické znázornenie výskytu najčastejších aberácií izolovane (modrá) a v kombinácii s ďalšími aberáciami (oranžová)



3. Určenie prognózy pacientov

Pomocou výsledkov vyšetrení z analýz vzoriek kostnej drene získaných metódami cytogenetiky, FISH a/alebo MLPA bola stanovená prognóza a medián prežívania 383 pacientom (**obrázok 7, tabuľka 2**). Hodnotené bolo zastúpenie jednotlivých pacientov v prognostických skupinách a ich celkové prežívanie.

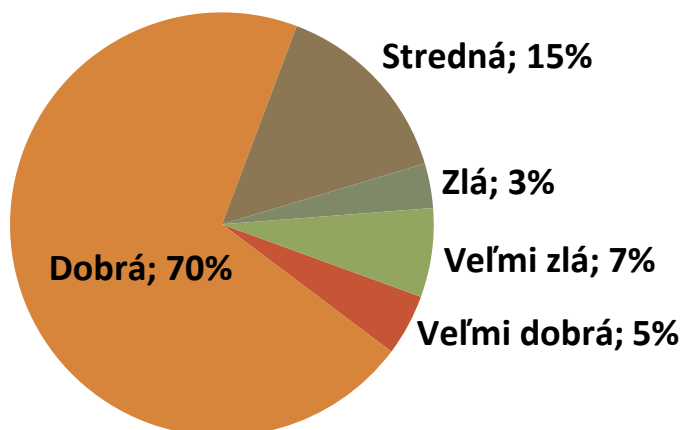
Medián prežívania sme vypočítali štatistickou Kaplanovou-Meierovou metódou spoločne pre 351 pacientov, od ktorých sme mali dostupné informácie o prežívaní, resp. úmrtí. Úspešne sme stanovili medián v skupinách: *stredná, zlá a veľmi zlá*. V skupinách *veľmi dobrá* a *dobrá* mali pacienti vyššie prežívanie a pri ich prognózach neklesla pravdepodobnosť prežitia pod 0,5 (50 %). Nezískali sme teda relevantné dáta, keďže veľká časť pacientov ešte stále žije (**obrázok 8**). Grafické zobrazenie demonštruje, že s horšou prognózou klesá aj prežívanie pacientov. V **tabuľke 3** je zhrnutie údajov z jednotlivých rizikových skupín. Zobrazené sú počty pacientov v skupinách, počet úmrtí a žijúcich v danej skupine a percento prežívania skupiny.

4. Stanovenie úspešnosti použítých metód

Všetkými troma metódami súčasne bolo vyšetrených 80 pacientov. Tento súbor slúžil na porovnanie úspešnosti použitých metód (**obrázok 9**). Porovnávali sme počet úspešných analýz jednotlivých metód, ktoré potvrdili aspoň jednu chromozómovú abnormalitu u konkrétnych pacientov.

FISH metóda zachytila chromozómové zmeny pri 66 (83 %) analýzách. Ukázala sa ako najcitlivejšia metóda na odhľad prítomnosti aberácií. Analýza karyotypu bola pozitívna pri 60 (75 %) prípadoch. Skriningová metóda MLPA preukázala porovnateľnú úspešnosť ako cytogenetická analýza. Znamenala pozitívny nález u 59 (74 %) pacientov.

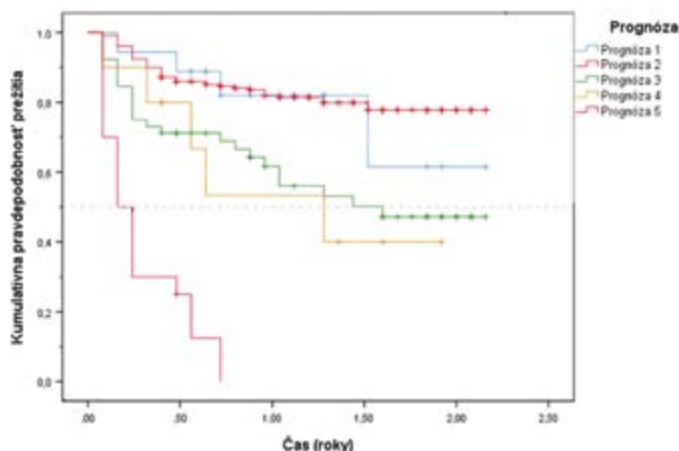
Obrázok 7. Grafické zobrazenie distribúcie prognostických skupín pacientov s MDS



Tabuľka 2. Rozdelenie pacientov do prognostických skupín podľa MDS cytogenetického skórovacieho systému

Prognostická skupina	Počet pacientov (%), n = 383	Medián prežívania (roky), n = 351
Veľmi dobrá	18 (5 %)	-
Dobrá	270 (70 %)	-
Stredná	56 (15 %)	1,6
Zlá	13 (3 %)	1,3
Veľmi zlá	26 (7 %)	0,2

Obrázok 8. Graf zobrazuje pravdepodobnosť prežitia pacientov v jednotlivých rizikových skupinách; prognóza 1 – **veľmi dobrá**, prognóza 2 – **dobrá**, prognóza 3 – **stredná**, prognóza 4 – **zlá**, prognóza 5 – **veľmi zlá**; pacientom s prognózou 1,2 pravdepodobnosť prežitia neklesla pod 0,5



Tabuľka 3. Súhrn dát pre jednotlivé rizikové skupiny

Prognostická skupina	Počet pacientov			Percento prežívania
	spolu	úmrť	žijúci	
Veľmi dobrá	18	4	14	77,8 %
Dobrá	251	48	203	80,9 %
Stredná	52	24	28	53,8 %
Zlá	10	5	5	50 %
Veľmi zlá	20	19	1	5 %
Celkovo	351	100	251	71,5 %

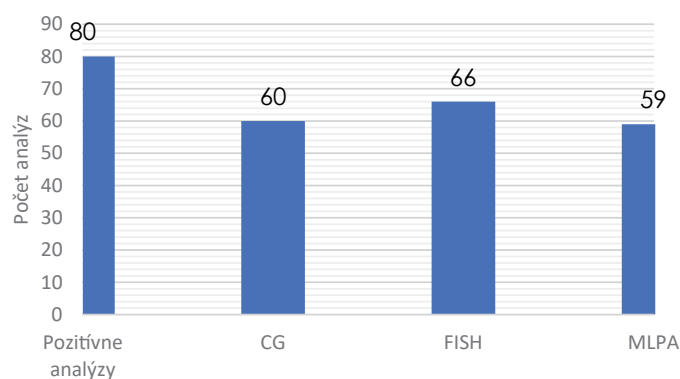
Diskusia

MDS je ochorenie prevažne starších ľudí s mediánom 70 rokov v čase diagnózy, skupinu pod 50 rokov tvorí ~ 10 % pacientov⁽²⁾. V našej práci bol vekový medián 69 rokov a počet pacientov mladších ako 50 rokov bol 15 %. Incidencia MDS rapídne stúpa s vekom nad 60 rokov. Greenberg a kol.⁽⁹⁾ uvádzajú, že až 77 % pacientov je v čase určenia diagnózy starších ako 60 rokov. V našej práci tvorili pacienti s vekom nad 60 rokov podiel 74 %.

Na štandardné analýzy bolo použitých 383 vzoriek kostnej drene a 237 vzoriek periférnej krvi. Pacienti vyšetrení zo vzorky kostnej drene mali patológie v 138 (36 %) prípadoch, pacienti vyšetrení zo vzorky periférnej krvi len v 34 (14 %) prípadoch. V literatúre sa udáva záchyt patológií v kostnej dreni pacientov v rozsahu od 37 do 55 %^(9,11,12). Ostatní pacienti mali negatívny nález. Štúdie, ktoré by uvádzali záchyt abnormalít z plnej periférnej krvi, nie sú k dispozícii. Na základe našich výsledkov môžeme konštatovať, že kostná dreň je oproti periférnej krvi vhodnejším biologickým materiálom na analýzy. Tu samotné ochorenie vzniká, je tu vyšší výskyt patologických buniek, a tým aj vyšší záchyt aberácií.

Z výsledkov vzoriek kostnej drene 383 pacientov, ktorí boli vyšetrení minimálne dvomi metódami z metód cytogenetiky, FISH a MLPA, boli charakterizované prítomné abnormality a následne bol stanovený výskyt tých najčastejších. V **tabuľke 4** sú porovnané naše údaje výskytu jednotlivých patológií so štúdiou s dostupnými údajmi. Naše údaje sa s literatúrou vo veľkej miere zhodujú. Tiež pomery izolovaných a kombinovaných chromozómových zmien sa zhodujú. Vzniknuté

Obrázok 9. Stanovenie úspešnosti jednotlivých metód; CG – cytogenetická analýza karyotypu



Tabuľka 4. Porovnanie výskytu aberácií v našom súbore MDS so štúdiou z roku 2007

Abnormalita	Náš výsledok (%), n = 383	Haase a kol., 2007 (%), n = 2 072
del(5q)	13,6 %	15,1 %
Izolovaná	5 %	7 %
Kombinovaná	8,6 %	8,1 %
+8	9,1 %	8,4 %
Izolovaná	3,7 %	3,9 %
Kombinovaná	5,4 %	4,5 %
-17/del(17p)	4,7 %	2 %
Izolovaná	0,5 %	0,1 %
Kombinovaná	4,7 %	1,9 %
-Y	4,4 %	2,8 %
Izolovaná	3,9 %	2 %
Kombinovaná	0,5 %	0,8 %
-7/del(7q)	4,2 %	11,1 %
Izolovaná	1 %	4,2 %
Kombinovaná	3,1 %	6,9 %
del(20q)	3,7 %	3,6 %
Izolovaná	1,3 %	1,7 %
Kombinovaná	2,3 %	1,9 %

rozdiely môžu byť spôsobené rôznou veľkosťou porovnávateľných súborov. Použitím výsledkov z vyšetrení získaných metódami cytogenetiky, FISH a MLPA bola stanovená prognóza pacientov. Hodnotené bolo zastúpenie pacientov v prognostických skupinách a ich medián prežívania. Prognóza pacientov bola určená prítomnosťou daných abnormalít v genóme. Porovnaním našich dát so štúdiami vypracovanými na iných pracoviskách bola pozorovaná významná korelácia dosiahnutých výsledkov. Naše výsledky prognóz pacientov porovnané s inými štúdiami sú uvedené v **tabuľke 5**. Spolu s prognózou sme vypočítali medián prežívania 351 pacientom v jednotlivých rizikových skupinách. Výpočtom sme získali relevantné výsledky pre skupiny: stredná, zlá a veľmi zlá. Pre skupiny s veľmi dobrým a dobrým rizikom sme nemali postačujúce údaje. Naš súbor pacientov bol sledovaný počas 2 rokov a pacienti z týchto skupín často dosahujú prežívanie vyššie než 2 roky, priemerne od 5,3 do 8,7 roka⁽¹⁹⁾. Štatistiky sme pre tieto dve skupiny dosiahli prognostickú hodnotu, pri ktorej neklesla pravdepodobnosť prežitia pod 0,5 (50 %). Medián prežívania v strednej prognostickej skupine tvoril 1,6 roka. V zlej prognostickej skupine bol 1,3 roka a vo veľmi zlej prognostickej skupine mal hodnotu len 0,2 roka. Naše dosiahnuté výsledky a porovnanie s inými štúdiami sú zobrazené v **tabuľke 6**.

Tabuľka 5. Porovnanie našich výsledkov zastúpenia pacientov v prognostických skupinách s výsledkami štúdií z roku 2012 (podľa IPSS-R)

Prognostická skupina	Počet pacientov (%)		
	Naše výsledky (n = 383)	Greenberg a kol., 2012 (n = 7 012)	Schanz a kol., 2012 (n = 2 754)
Veľmi dobrá	18 (5 %)	255(4 %)	83 (3 %)
Dobrá	270 (70 %)	5069(72 %)	1817 (66 %)
Stredná	56 (15 %)	947(13 %)	523 (19 %)
Zlá	13 (3 %)	283(4 %)	138 (5 %)
Veľmi zlá	26 (7 %)	458(7 %)	193 (7 %)

Dôvodom, prečo nám vyšli nižšie hodnoty mediánu prežívania a nedosiahli sme výsledky pre skupiny s veľmi dobrou a dobrou prognózou, môže byť krátke obdobie sledovania pacientov. Naše výsledky potvrdili, že so zhoršovaním prognózy sa skraca celkové prežívanie pacientov.

Porovnávali sme tiež úspešnosť použitých diagnostických metód. Vyhodnocovali sme súbor pacientov, ktorí boli naraz vyšetrení všetkými tromi metódami. Pacienti nemohli mať negatívny nález a metódy museli zachytiť aspoň jednu abnormalitu.

FISH metóda sa ukázala ako najcitlivejšia na odhalenie prítomnosti patológií. Úspešne zachytila patológiu v 85 % prípadov. FISH má vysokú citlivosť a špecifitu k cieľovej oblasti v DNA. Deteguje abnormality s rozlíšením od 100 kb do 1 Mb, ale zachytí len oblasť chromozómu, pri ktorej je použitá sonda. Analýza karyotypu (75 %) a metóda MLPA (74 %) preukázali porovnateľnú úspešnosť. Karyotypová analýza zachytáva numerické a štruktúrne aberácie naraz na všetkých chromozómoch do detekčného limitu okolo 5 Mb a je obmedzená neúspešnou kultiváciou buniek v médiu⁽²⁰⁾.

LITERATÚRA

- Vondráková J. Myelodysplastický syndrom, diagnostika a liečba. Interni Med 2010; 12(11): 535-539.
- Germing U, Kobbe G, Haas R, Gattermann N. Myelodysplastic syndromes: diagnosis, prognosis and treatment. Dtsch Arztebl Int 2013; 110(46): 783-790. doi: 10.3238/arztebl.2013.0783.
- Rau ATK, Shreedhara AK, Kumar S. Myelodysplastic Syndromes in Children: Where Are We Today? Ochsner J. 2012; 12(3): 216-220.
- Neuwirtová R. Myelodysplastický syndrom: onkohematologické onemocnění vyššího věku. Čes Ger Rev 2005; 3(2): 21-28.
- Adès L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. Lancet 2014; 383(9936): 2239-2252.
- Larson RA. Therapy-related myeloid neoplasms. Haematologica 2009; 94(4): 454-459.
- Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. Blood 2007; 110(13): 4385-4395.
- Jonas BA, Greenberg PL. MDS prognostic scoring systems – past, present, and future. Best Pract Res Clin Haematol 2015; 28(1): 3-13.
- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. Blood 2012; 120(12): 2454-65.
- Zatkova A, Merk S, Wendeck M, et al. AML/MDS with 11q/MLL Amplification Show Characteristic Gene Expression Signature and Interplay of DNA Copy Number Changes. GENES, CHROMOSOMES & CANCER 2009; 48: 510-520.
- Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. Ann Hematol 2008; 87(7): 515-526.

Tabuľka 6. Porovnanie našich výsledkov mediánu prežívania pacientov v jednotlivých prognostických skupinách s výsledkami štúdií z roku 2012 (podľa IPSS-R)

Prognostická skupina	Medián prežívania (roky)		
	Naše výsledky (n = 383)	Greenberg a kol., 2012 (n = 7 012)	Schanz a kol., 2012 (n = 2 754)
Veľmi dobrá	-	5,4	5,1
Dobrá	-	4,8	4,1
Stredná	1,6	2,7	2,2
Zlá	1,3	1,5	1,3
Veľmi zlá	0,2	0,7	0,5

Metóda MLPA umožňuje súčasne skrining 46 špecifických oblastí, v ktorých sú zahrnuté aj menej frekvencované MDS abnormality. Jej obmedzením je však to, že nedokáže zachytiť balansované genetické prestavby a potrebuje aspoň 25 – 30 % postihnutých buniek vo vzorke⁽²¹⁾.

Záver

Incidencia MDS v súčasnosti v Európe stúpa a predpokladá sa každoročne nárast o 25 000 nových prípadov. Dôvodom je nielen starnutie populácie, ale aj nárast znečistenia prostredia. Preto je veľmi dôležitá presná diagnostika pacientov, správne stanovenie prognózy a následne nastavenie vhodnej terapie. V diagnostike aberácií sa dnes využívajú štandardné genetické metódy ako cytogenetické vyšetrenie karyotypu, metóda FISH a MLPA analýza, z ktorých má každá svoje nezameniteľné miesto a ich vzájomná kombinácia je zárukou zachytenia čo najväčšieho počtu aberácií v genóme pacienta s MDS.

- Schanz J, Tüchler H, Solé F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. J Clin Oncol 2012; 30(8): 820-829.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res 2002; 30(12): e57.
- Donahue AC, Abdool AK, Gaur R, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for detection of chromosomal abnormalities in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. Leuk Res 2011; 35(11): 1477-83.
- Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, et al. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. Stem Cells 2014; 32(6): 1380-89.
- Marisavljevic D, Kruljac-Kurtovic N. Biological implications of circulating CD34(+) cells in myelodysplastic syndromes. J BUON 2010; 15(4): 753-757.
- Liang X, Xu K, Xu J, et al. Preparation of immunomagnetic nanoparticles and their application in the separation of mouse CD34⁺ hematopoietic stem cells. Journal of Magnetism and Magnetic Materials 2009; 321(12): 1885-88.
- Demir GS, Okur AC, Kizilel S. Synthesis and design of biologically inspired biocompatible iron oxide nanoparticles for biomedical applications. J Mater Chem B 2015; 3: 7831-7849.
- <https://www.mds-foundation.org/wp-content/uploads/2011/12/2-Revised-InternationalPrognosticScoringSystem.pdf>
- https://www.biomnis.com/wpcontent/uploads/2016/04/56-INTGB-Focus_Karyotyping_SNP_array.pdf
- http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?Tag=_G1U3P-YAOzf2SFuaxkq4YJruAlwx3T3q8uAJJ_V-Ws



RNDr. Andrea Blahová

Lekárska genetika, Medirex, a. s.
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
e-mail: andrea.blahova@medirex.sk